

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

**Resistência antimicrobiana no
Microbiota respiratório do Doente com
Fibrose Quística.**

André Nunes Miranda

JULHO'2019



TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Pediatria

Resistência antimicrobiana no Microbiota respiratório do Doente com Fibrose Quística.

André Nunes Miranda

Orientado por:

Maria Celeste Canha Coelho Barreto

JULHO'2019

Resumo

A Fibrose Quística é uma doença genética cuja prevalência varia consoante os países. A doença caracteriza-se por sintomas de doença pulmonar crónica e de má absorção intestinal. A grande causa de morbilidade e mortalidade nestes pacientes é a doença pulmonar crónica caracterizada por infeções respiratórias recorrentes. Ao nível do pulmão, para além do processo infeccioso há uma resposta inflamatória marcada com impacto negativo na deterioração da função pulmonar. A esperança de vida aumentou para mais de 40 anos muito devido à instituição de terapêutica antibiótica oral, endovenosa ou inalada, preconizada para o controlo das infeções pulmonares, nomeadamente no primeiro isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* e na terapêutica de supressão para a infeção crónica. Contudo, a maior sobrevida e a frequente administração de antimicrobianos tem como consequência o isolamento de bactérias multirresistentes. A definição de resistência antimicrobiana no contexto da fibrose quística tem sido tema de reflexão e vai ser abordado ao longo do trabalho. Atualmente, é consensual que o microbiota é, também, um fator integrante da fisiopatologia de algumas doenças, nomeadamente da fibrose quística. Ao longo do trabalho serão abordadas as principais evidências acerca desta relação e a forma como se devem interpretar estes novos conhecimentos e a sua possível aplicação para melhor tratar os pacientes. Pretende-se responder às questões: será a microbiota um novo alvo terapêutico? Como interpretar, valorizar e atuar, consoante o padrão de resistência aos antimicrobianos presente no microbioma? Este trabalho procura sintetizar e relacionar todos estes conceitos, à luz da mais recente evidência científica e opinião de peritos na área.

Palavras-chave: “Fibrose quística”, “Inflamação”, “Infeção”, “Resistência aos antimicrobianos”, “Microbiota”.

O trabalho final exprime a opinião do autor e não da FML.

Abstract

Cystic Fibrosis is a genetic disease with different prevalence among countries. The disease is characterized by symptoms of chronic lung disease and intestinal malabsorption. The major cause of morbidity and mortality, in these patients, is chronic lung disease characterized by chronic respiratory infections. In the lung, in addition to the infectious process, there is a marked inflammatory response, with negative influence on the deterioration of lung function. The life expectancy increased to more than 40 years due to the institution of oral, intravenous or inhaled antibiotic therapy, recommended for the control of pulmonary infections, namely in the first isolation of *Pseudomonas aeruginosa*, and, also used, as suppression therapy for chronic infection. Increased life expectancy and frequent administration of antimicrobials results in the isolation of multiresistant bacteria. The definition of antimicrobial resistance in the context of cystic fibrosis has been subject of reflection and will be approached throughout the work. Presently, it is consensual that the microbiome is an integral factor of the pathophysiology of some diseases, namely cystic fibrosis. The main evidence on this relationship, how this new knowledge will be interpreted and its possible application to better treat patients will be presented. The aim is to answer the following questions: is the microbiome a new therapeutic target? How to translate these new ideas to clinical practise, depending on the antimicrobial resistance pattern present in the microbiome? This work seeks to synthesize and relate all these concepts, by reviewing the latest scientific evidence and opinion of experts in the field.

Keywords: “Cystic Fibrosis”, “Inflammation”, “Infection”, “Antimicrobial resistance”, “Microbiome”.

This Final Paper expresses the author opinion and not of FML.

Índice

Lista de Abreviaturas	1
Introdução	2
Métodos	3
Contextualização da Fibrose Quística	4
Resistência antimicrobiana na Fibrose Quística	10
O Microbioma na Fibrose Quística.....	16
Importância do Microbioma na avaliação da Resistência aos Antimicrobianos	21
Comentários finais	22
Agradecimentos	23
Bibliografia	24

Lista de Abreviaturas

FQ – Fibrose Quística

CFTR – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

FEV1 – Volume expiratório máximo no 1º segundo

ECFS – European Cystic Fibrosis Society

ENaC – Canal de sódio epitelial

DNA – Ácido desoxirribonucleico

IL-8 – Interleucina 8

LTB-4 – Leucotrieno B4

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL-1R – Recetor interleucina 1

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

MIC – Concentração inibitória mínima

TSA – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Introdução

A Fibrose Quística (FQ) é uma doença rara autossômica recessiva. Esta foi primeiramente descrita em 1938 por Dorothy Andersen em autopsia de pacientes malnutridos designando-se de “fibrose quística do pâncreas”, pela morfologia microscópica do tecido pancreático. Foi descrita como uma doença multissistêmica com fenótipo de mal absorção de gorduras e proteínas, esteatorreia, atraso do crescimento e infecções pulmonares recorrentes (1).

Atualmente, considera-se a FQ como uma exocrinopatia dos órgãos que expressam o gene da FQ, nomeadamente os pulmões, fígado, pâncreas, intestino e órgãos reprodutivos (2–4).

A fisiopatologia da doença tem suscitado debates intensos pela mudança de paradigma do estímulo inicial da lesão pulmonar. Numa doença como a FQ, em que as infecções pulmonares são controladas com regimes agressivos de antibióticos, torna-se evidente a necessidade de uma abordagem racional da resistência aos antimicrobianos, que tem as suas particularidades. Ao longo da história natural da doença estabelecem-se alterações características na microbiota pulmonar, com um aumento da carga bacteriana e diminuição da diversidade de espécies. Acompanhando estas alterações no início tem-se uma colonização por microorganismos potencialmente patogénicos, que progride para uma infeção crónica. Neste contexto, é importante considerar estas várias fases da história natural da doença pulmonar e como a utilização dos antibióticos é importante para cada fase da infeção/colonização (5). Deste modo, ao relacionar os novos conhecimentos acerca da fisiopatologia da FQ, os avanços recentes na área do microbiota pulmonar, assim como os avanços na interpretação da resistência antimicrobiana, poder-se-á abordar o paciente com um substrato racional maior e com benefícios na sobrevida e na qualidade de vida.

Métodos

Para a elaboração do presente trabalho foram definidos dois objetivos principais: 1) caracterizar o microbiota pulmonar e 2) a resistência a antibióticos, nos pacientes com fibrose quística. Para contextualizar o trabalho serão abordados conceitos gerais da doença, aprofundando os conceitos de infecção, inflamação e interação microorganismo-hospedeiro;

Dado o carácter particular da fibrose quística, a pesquisa foi primeiramente realizada através da *PubMed* na revista *Journal of Cystic Fibrosis* filtrando os resultados com os seguintes termos, em texto livre, ““*Cystic Fibrosis*”, “*CFTR*”, “*target therapy*”, “*inflammation*”, “*infection*”, “*antimicrobial therapy*”, “*antimicrobial resistance*”, “*antimicrobial susceptibility testing*”, “*microbiome*”, “*microbiota*”, “*probiotics*”, cruzando os mesmos.

Selecionaram-se os artigos para leitura integral com base na leitura do resumo. Seguindo-se de uma referenciação cruzada de modo a investigar outras fontes a incluir na presente revisão narrativa.

Por último, recorreu-se também a literatura cizenta, nomeadamente os resumos da conferência “*The 32nd Annual North American Cystic Fibrosis Conference*”, de modo a considerar os conhecimentos mais recentes.

Contextualização da Fibrose Quística

Relativamente à epidemiologia da FQ, as regiões a nível mundial com maior prevalência são Europa, América do Norte e Austrália (6). A prevalência estimada da FQ em Portugal é 1 para 7500 nados-vivos (7).

A esperança média de vida nos anos 40 era menos de 1 ano, nos anos 90 aproximadamente 28 anos e, atualmente, em países desenvolvidos chega a ultrapassar os 40 anos (6,8,9). Atualmente, segundo dados do UK Cystic Fibrosis Registry, a sobrevivência média estimada é de 47 anos (10), deixando de se caracterizar como uma doença exclusivamente pediátrica para passar a ser uma doença também do adulto. Em Portugal, segundo os dados de 2016, 43,92% dos pacientes são adultos (11).

Atualmente, pode afirmar-se que os maiores avanços obtidos se devem à utilização de enzimas pancreáticas para controlo da má absorção, assim como da melhoria do controlo das infeções respiratórias crónicas através da utilização de antibióticos, com carácter de irradicação, “curativo” e supressivo (5). Um dado importante é a relação entre a progressão da doença e a colonização por *P. aeruginosa*, de tal modo que o sucesso da sua erradicação é um bom preditor da sobrevida.

A principal causa de morte continua a ser a doença pulmonar crónica, apesar dos avanços que se obtiveram na identificação precoce da doença, através do diagnóstico neonatal e de um melhor reconhecimento precoce do quadro clínico, e estabelecimento de uma terapêutica sintomática eficaz e dirigida (12). Assim se justifica que atualmente os principais objetivos a alcançar nos pacientes com fibrose quística sejam 1) aumentar a percentagem de crianças que atinge a idade adulta não colonizados por *P. aeruginosa* e 2) aumentar a percentagem de crianças que atinge a idade adulta com um FEV1 dentro dos valores normais de referência.

A alteração genética subjacente à FQ é uma mutação no gene *CFTR*, localizado no braço longo do cromossoma 7 (7q31.2), que codifica a síntese de uma proteína com função canal de cloreto e outros aniões, denominada de *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*.

Atualmente estão descritas mais de 2000 mutações, sendo a maioria *missense* (13). Em Portugal de acordo com os dados do ECFS Registry a cobertura de genotipagem é de

100% (11), encontrando-se a mutação F508del, a mais frequente, em 79% dos pacientes (7).

De acordo com o defeito da proteína, estão descritas 6 classes de mutações, apresentadas no quadro 1 (6).

Quadro 1 – Classes de mutações do gene *CFTR*

	Classe I	Classe II	Classe III	Classe IV	Classe V	Classe VI
Defeito de <i>CFTR</i>	Sem <i>CFTR</i> funcional	Defeito no processamento de <i>CFTR</i>	Defeito na regulação do canal	Diminuição da condutância do canal	Síntese reduzida de <i>CFTR</i>	Estabilidade reduzida do <i>CFTR</i>
Tipo de mutações	Nonsense; frameshift; canonical splice	Missense; deleção de aminoácido	Missense; alteração de aminoácido	Missense; alteração de aminoácido	Defeito do splicing; missense	Missense; alteração de aminoácido

A FQ é uma doença multiorgânica, heterogénea e com diferentes manifestações consoante a mutação do gene *CFTR*, pelo que, o conjunto de manifestações clínicas que se pode observar é heterogéneo (14).

No quadro 2, sintetizam-se os fenótipos clínicos presentes nos pacientes com FQ, de acordo com a idade do paciente (quadro 2).

Quadro 2 – Fenótipos Clínicos de FQ (9,15)

Período neonatal / 1º ano de vida	Idade pré-escolar / Escolar	Adolescente / Adulto
Íleus Meconial Icterícia Prolongada Hipoproteinémia/edema Má progressão estaturponderal Esteatorreia Diarreia Crónica Bronquiolite Bronquite Hiponatremia Golpe de calor Prolapso retal	Tosse persistente com ou sem expectoração Pieira recorrente Hipocratismo digital Má progressão estaturponderal Hepatomegalia ou doença hepática Diarreia Crónica Prolapso retal Doença pulmonar crónica supurativa Asma com infeções e alterações radiológicas Síndrome de obstrução intestinal distal Polipose nasal Sinusopatia crónica	Doença pulmonar crónica supurativa Diabetes mellitus com sintomatologia pulmonar Cirrose biliar focal ou multilobular Pancreatite idiopática crónica Atraso na puberdade Infertilidade masculina por azoospermia Fertilidade feminina diminuída

O diagnóstico de FQ, segundo a Norma de Orientação Clínica nº 031/2012 “Diagnóstico da Fibrose Quística em Idade Pediátrica e no Adulto”, realiza-se seguindo um algoritmo clínico (15).

Está indicada a avaliação, recorrendo ao algoritmo clínico, caso existam sintomas clínicos sugestivos de FQ e/ou um rastreio neonatal positivo, ou a presença de um irmão com FQ (15). Nestes casos está indicada a realização de uma prova de suor quantitativa, em que valores inferiores a 30 mmol/L são considerados normais, entre 30 e 59 mmol/L são considerados intermédios, e superiores a 60 mmol/L são patológicos. Para o diagnóstico, é necessário que esteja presente um dos seguintes critérios: a presença de características fenotípicas, ou teste de rastreio neonatal positivo ou história de FQ num irmão, mais 2 medições de concentração de cloreto no suor elevada ($>60\text{mmol/L}$), ou identificação de 2 mutações do gene *CFTR* conhecidas como causadoras de FQ, ou demonstração *in vivo* da alteração típica do transporte iónico através do epitélio nasal na FQ ou *in vitro*, estudo da secreção de Cl^- transepitelial a nível do epitélio intestinal obtido através de biópsias retais, que discrimina os indivíduos que apresentam secreção do ião dos indivíduos sem secreção (15–17)

Para compreender a fisiopatologia, é necessário ter em mente que a proteína *CFTR* (18) se localiza na membrana apical das células epiteliais, funciona como canal regulador de transporte de cloreto e outros aniões e regula o volume e composição das secreções exócrinas (2).

O canal *CFTR* a nível pulmonar é responsável pela regulação da composição do fluido epitelial. A sua disfunção traduz-se por desidratação do fluído na superfície das vias aéreas, com formação de muco espesso, ineficaz para o transporte mucociliar e consequentemente criação de condições para o aparecimento de infeções e inflamação. Esta mesma fisiopatologia verifica-se nos outros epitélios exócrinos, com aumento da viscosidade e as suas consequências individuais em cada órgão, nomeadamente no pâncreas (o que conferia o nome original da doença: fibrose quística do pâncreas) com destruição tecidual e falência do órgão, primeiramente o exócrino e de seguida o endócrino, e no fígado com cirrose multilobular, por obstrução dos ductos biliares intrahepáticos. Também é afetada a fertilidade, particularmente relevante no sexo masculino, com uma taxa de aproximadamente 99% de infertilidade, por uma azoospermia obstrutiva, por atresia dos *vas deferens* e/ou dos epidídimos (2).

O defeito da função do canal expressa-se por alterações no transporte do ião cloreto e bicarbonato, contudo, este tem também outras funções por interação com outros canais, nomeadamente o canal de sódio (ENaC), e com vias intracelulares, como por exemplo, de inflamação (inflamassoma) (6). As alterações de função do canal promovem mudanças no pH das secreções brônquicas. Este facto relaciona-se com uma maior suscetibilidade para infeções por uma deficiência na imunidade inata, nomeadamente na atividade de péptidos antimicrobianos (6,18).

A relação entre a inflamação e a infeção das vias aéreas nos pacientes com FQ parece ser um dilema “o que surgiu primeiro: o ovo ou a galinha?” (18). Estudos em pacientes sugerem resultados dispares tornando esta questão controversa (19,20). Um dado indiscutível é que a doença pulmonar é objetivável numa percentagem significativa de crianças aos 3 meses de idade, na ausência de isolamento de microorganismos patogénicos.

Os estudos em modelos animais revelam resultados dispares. O modelo de FQ no porco apresenta lesões estruturais e vias aéreas com maior carga bacteriana, embora não apresente sinais de inflamação à nascença, sugerindo que a infeção precede a inflamação. Por outro lado, o modelo de FQ no rato demonstra uma maior resposta inflamatória na presença de estímulos, por comparação com ratos *wild-type*, não apresentando, contudo, estigmas como infeção respiratória crónica ou bronquiectasias progressivas, não sendo, portanto, um modelo representativo da doença crónica. O modelo de porco aponta para que a inflamação não seja significativa antes da infeção, mas que após esta se estabeleça uma resposta inflamatória acentuada, sendo que, deste modo, a infeção precede a inflamação (20), tal como alguns estudos em humanos parecem demonstrar. O modelo de furão exhibe um aumento da inflamação, na ausência de infeção, no entanto, apresenta infeção respiratória grave muito precocemente, ao contrário do fenótipo encontrado no ser humano (21,22). Outros estudos em modelo de furão, demonstram que se consegue prevenir a infeção com o recurso ao uso de combinações de antibióticos; os furões apresentam, porém, inflamação independente da presença de infeção, com presença de obstrução brônquica e bronquiectasias, ainda que com um grande aumento da sobrevivência (23).

O estado inflamatório presente nas vias aéreas destes pacientes está relacionado com vários fatores. O próprio defeito do canal *CFTR* parece ter como consequência alterações da regulação de vias de inflamação. A inflamação na FQ caracteriza-se por ser

mediada por neutrófilos com libertação de proteases, oxidantes, DNA e citocinas inflamatórias (IL-8 e LTB-4) (24). Por outro lado, o mesmo defeito também aumenta a suscetibilidade para infeções e para colonização por bactérias potencialmente patogénicas, pelos mecanismos já explicados, o que também promove um substrato pró-inflamatório nestes pacientes (24,25). Este maior substrato inflamatório associado a uma infeção crónica das vias respiratórias culmina numa lesão tecidual significativa, agravando a função pulmonar, particularmente nos períodos de exacerbações (2).

Assim, alguns dados sugerem que a inflamação pode ser dissociada da infeção, o que é denominado de inflamação estéril, e que é evidenciado pelo facto de a inflamação poder ser identificada antes de se reconhecer a presença de patogénicos característicos da FQ (26).

Os rolhões de muco que obstruem os brônquios, devido ao aumento da viscosidade das secreções, apresentam-se como um ótimo meio de cultura e um nicho para a proliferação de bactérias patogénicas (27). Todavia, postula-se se esta acumulação de muco tem também como consequência uma inflamação sem isolamento prévio de bactérias, o que parece estar de acordo com as evidências em modelos animais (23,28) e estudos em humanos (29). A fisiopatologia subjacente é a hipoxia celular e a necrose secundária, que promove a libertação de IL-1 α que estimula a via IL-1R com ativação do gene de resposta de diferenciação primária mieloide 88 e, consequente inflamação neutrofílica. (30,31). Assim, conclui-se que os rolhões de muco são, *per se*, pró-inflamatórios e podem despoletar doença inflamatória na ausência de infeção.

Desta forma, uma explicação mais provável e precisa da fisiopatologia é de que a obstrução precoce conduza a uma hipoxia local, com inflamação neutrofílica, desenvolvendo-se infeções bacterianas secundárias, ainda com a possibilidade de maior resposta inflamatória secundária a infeções virais.

Novos fármacos estão atualmente em ensaios clínicos para tentar abordar esta via da fisiopatologia da doença muito associada à progressão da doença e deterioração da função pulmonar (25). Atualmente, a maior evidência está descrita para o uso do ibuprofeno e de alguns antibióticos que parecem ter efeito anti-inflamatório, nomeadamente a azitromicina (25,32). A azitromicina, para além dos efeitos antimicrobianos, tem descritos efeitos anti-inflamatórios e, consequentemente, efeitos benéficos decorrentes do atraso do *remodelling* pulmonar (33). Estes efeitos traduzem-

se na diminuição da inflamação, pela supressão de mediadores pró-inflamatórios (IL-8 e TNF- α), assim como na diminuição de produção de oxidantes pelos neutrófilos e interferindo com a produção de biofilmes e com o *quorum sensing* da *P. aeruginosa* (33). Contudo, o tratamento com azitromicina pode antagonizar o efeito da tobramicina em pacientes infetados com *P. aeruginosa* (34), assim como o tratamento prolongado com azitromicina promove um aumento na resistência aos macrólidos em *S. aureus* e *H. influenzae* (35,36).

Relativamente à influência da infecção na fisiopatologia da FQ, as infecções do trato respiratório por vírus e bactérias, secundárias à diminuição da *clearance* mucociliar, nomeadamente por *Haemophilus influenza* e *Staphylococcus aureus* resulta em lesão direta pelas bactérias e lesão indireta pelos efeitos da infecção na resposta inflamatória local (37). A doença progride, estabelecendo-se as bronquiectasias, pela lesão epitelial e défices imunitários locais. As bronquiectasias são um local propício para a proliferação de bactérias patogénicas, como a *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter* spp, complexo *Burkholderia cepacia* e micobactérias não tuberculosas como: a *Mycobacterium abscessus* e a *Mycobacterium avium-intracellulare*. O tratamento destas infecções é complexo devido às suas particularidades, como a elevada taxa de resistências antimicrobianas intrínsecas destes patógenos (6).

Resistência antimicrobiana na Fibrose Quística

A prevalência da resistência a antimicrobianos tem vindo a aumentar globalmente, como consequência da difusão da utilização das diversas classes destes fármacos, que causam uma pressão seletiva, levando a que as bactérias que possuem genes que lhes conferem resistência sejam cada vez mais prevalentes (38).

As infeções causadas por bactérias multirresistentes são classicamente associadas a mais cuidados de saúde, com maior prescrição de antibióticos. Nos pacientes com FQ, observa-se um aumento de isolamento de estirpes resistentes, secundariamente à pressão seletiva exercida pelo tratamento com antimicrobianos, que promove a aquisição de mutações e aumenta a produção de biofilmes. Também os mecanismos de resistência intrínseca tem elevada importância nestes pacientes dado o isolamento de bactérias que são intrinsecamente resistentes a muitos antibióticos (39).

Estes pacientes estão mais suscetíveis a infeções pulmonares crónicas por bactérias potencialmente patogénicas, como por exemplo *S. aureus* (incluindo metilicina-resistente), *P. aeruginosa*, complexo *Burkholderia cepacia*, *H. influenza*. Para além destas bactérias, são ainda isolados outros microorganismos com carácter oportunístico, nomeadamente *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia* e micobactérias não tuberculosas como *Mycobacterium abscessus* (40). O tratamento destas está muito dependente da utilização de antibióticos, cujos diversos ciclos de tratamento aumentam a emergência de resistência antimicrobiana e a seleção de estirpes resistentes, aumentando a prevalência de bactérias multirresistentes nestes pacientes (5). As doses subterapêuticas, por vezes administradas, são também indutoras de resistência (41).

Para facilitar a compreensão do tema, abordam-se as definições relacionadas com a resistência antimicrobiana. De uma forma geral, define-se resistência antimicrobiana como a ausência de eficácia na erradicação ou inibição da atividade do microorganismo (39). Para avaliar a resistência ou suscetibilidade utiliza-se a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) que se define como a concentração mínima para inibir o crescimento de um isolado bacteriano. Os *breakpoints* são valores de MIC que permitem classificar uma bactéria em susceptível, resistência intermédia ou resistente a um determinado antibiótico. Estes *breakpoints* são determinados com base na MIC *in vitro* para cada par microorganismo-antibiótico, em relação com a concentração sérica ou

tecidual que é passível de ser alcançada. Como fator limitante da concentração alcançável tem-se as características inerentes de cada tecido e antibiótico, como a irrigação ou o volume de dispersão, contudo, outro factor de relevo é a margem terapêutica e toxicidade do antibiótico (39,42).

Na prática clínica traduz-se como uma ausência de suscetibilidade da bactéria ao agente antimicrobiano, o que também se pode designar de resistência fenotípica. Por outro lado, pode ter-se resistência genotípica, que se avalia pela presença de genes (ou mutações genéticas) que conferem a resistência ao agente antimicrobiano. Ainda assim, a detecção de resistência genotípica pode não se traduzir por resistência fenotípica, pelas particularidades da infecção *in vivo*, nomeadamente a expressão diferencial de genes consoante o ambiente ou mesmo uma expressão baixa do gene que não se traduz numa resistência significativa (39).

Para demonstrar a complexidade do tema, pode ainda colocar-se o caso de uma suscetibilidade de um determinado organismo a um agente antimicrobiano *in vitro*, que não se traduz *in vivo*, o que pode ser designado de resistência clínica (39,43,44).

Diversos fatores podem influenciar a resistência clínica, nomeadamente fatores do antibiótico, do microorganismo e do hospedeiro.

A eficácia do antibiótico está dependente da via de administração, da capacidade de atingir concentrações eficazes no local de infecção, da terapêutica concomitante com dornase alfa, cloreto de sódio hipertónico, da ligação do antibiótico ao muco, assim como as características do ambiente do local de infecção, nomeadamente o pH, concentração de iões e a anaerobiose (39,45).

Os fatores do microorganismo que podem influenciar a resistência antimicrobiana são o número do inóculo, a capacidade de formar biofilmes, o estado biológico da bactéria (resistência intrínseca), o estado de tolerância (por diminuição velocidade de crescimento) ou persistência (associado a dormência) (42).

Por último, fatores do hospedeiro são não menos importantes. Destes destacam-se deficiências no sistema imune e, ainda mais relevante nos pacientes com fibrose quística, a ineficaz *clearance* mucociliar.

Existem dois tipos de resistência aos antimicrobianos: intrínseca e adquirida.

A resistência aos antimicrobianos relaciona-se com as características intrínsecas de cada espécie de bactéria. Por exemplo, a *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente à vancomicina pelas características da parede celular que esta bactéria apresenta. Para além deste exemplo, tem-se também outras estirpes que tem adquirido cada vez mais relevância nos isolados microbiológicos das vias aéreas destes pacientes, o complexo *Burkholderia cepacia*, espécies de *Achromobacter*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Mycobacterium abscessus* (39).

Dentro da resistência a antimicrobianos adquirida tem-se vários mecanismos. Podem ocorrer por mutações cromossómicas ou por transferência horizontal de genes (46).

Um conceito importante a ter em consideração no caso das mutações cromossómicas é o de “hipermutador”, que descreve um isolado bacteriano com maior rácio de mutações por defeitos genéticos nos mecanismos de correção de DNA (39,42).

No caso de transferência horizontal de genes a resistência tem origem exógena. Pode ter origem noutras bactérias por transformação (captação de DNA livre do meio), transdução (transferência de DNA via bacteriófagos) ou conjugação (via plasmídeos). A conjugação é uma forma particularmente importante em meio hospitalar, nomeadamente no intestino dos pacientes sujeitos a terapêutica antibiótica (47).

Os plasmídeos são sequências de DNA extracromossómico que codificam vários genes importantes, nomeadamente genes que conferem resistência a antibióticos. Estes plasmídeos podem ser transferidos entre espécies de bactérias, o que lhes confere uma importância ainda maior como forma de aquisição de resistência pela variada comunidade bacteriana que coloniza e infeta os pacientes com FQ. Após serem transferidos para uma bactéria podem manter-se como DNA extracromossómico ou mesmo ser integrados no DNA cromossómico, conferindo-lhe uma estabilidade superior (46). O isolamento de carbapenemases mediadas por plasmídeo tem sido cada vez mais reconhecido em *P. aeruginosa* (39).

A expressão de genes que conferem resistência a antimicrobianos têm um elevado custo metabólico para as bactérias que se traduz numa diminuição do rácio de multiplicação e de transmissão, para além da sua virulência, o que limita a sua manutenção na ausência de uma pressão seletiva positiva (isto é, a presença do antibiótico) (39,42).

Outro custo da resistência é a sensibilidade colateral a outro antibiótico, por exemplo, aumento da sensibilidade a aminoglicosídeos na presença de resistência a ciprofloxacina em estirpes de *P. aeruginosa* (39).

Variados mecanismos compensatórios surgiram para contornar estas limitações. Um exemplo destes mecanismos é a expressão induzida do mecanismo de resistência, por oposição da expressão constitutiva (sempre presente), ao acoplar o gene que confere a resistência a um fator desencadeante externo (48).

Estas adaptações e custos são de elevada importância na FQ dada a repetida exposição a antibióticos e muitas vezes o tratamento não curativo, mas sim supressivo das infeções (5).

Os mecanismos de resistência são sofisticados e variados, requerendo, por vezes, alteração de organelos ou enzimas celulares.

Destacam-se os seguintes mecanismos de resistência: modificação ou degradação do antibiótico, bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade, sequestração do antibiótico em proteínas, modificação do alvo e proteção do alvo (49).

Estes conceitos, previamente apresentados, têm por base uma infeção monobacteriana aguda (39). A suscetibilidade ou resistência classicamente é definida para um isolado bacteriano, na ausência de consideração pelas diferentes particularidades referidas do ambiente de infeção e das bactérias, como a produção de biofilmes, que aumentam a resistência aos antimicrobianos por não permitir que estes se solubilizem, diminuir a sua difusão e diminuir a sua atividade (hipoxia), ou mesmo permitindo a que exista o acumular de enzimas, que inativam antibióticos, e de moléculas de *quorum-sensing*, e transferência horizontal de genes (40). Assim, verifica-se uma disparidade entre a resistência avaliada laboratorialmente e a que se observa na prática clínica (50).

Na fibrose quística verifica-se que a maior parte das infeções, não só são crónicas, como também polimicrobianas, podendo ser causadas por uma vasta comunidade constituída por bactérias, vírus e fungos, constituindo o microbiota. As interações entre estes microrganismos podem condicionar alteração do comportamento que apresentariam de uma forma mais isolada, nomeadamente da resistência antimicrobiana (51).

Constata-se que na fibrose quística a terapêutica antimicrobiana de prevenção e de supressão, para as infeções crónicas, assim como a maior parte da terapêutica das

exacerbações é constituída por pelo menos um antibiótico numa formulação inalada (5). Deste modo, consegue obter-se uma concentração de antibiótico até 100 vezes superior, à passível de ser obtida por outras vias de administração. Obtêm-se, assim, valores superiores à MIC, tornando uma bactéria que era resistente nos testes de suscetibilidade numa bactéria sensível, com menos efeitos secundários, por uma baixa absorção sistémica por via pulmonar (12,39,43).

Em casos de infeções monobacterianas agudas um resultado sensível num TSA corresponde a uma resposta clínica de 90-95%. Contudo, quando resistentes, a resposta é favorável em apenas 66% (52).

Dadas as particularidades da FQ, com infeções polimicrobianas, produtoras de biofilmes, alterações das características biofísicas do pulmão e da utilização de antibióticos inalados, os testes de suscetibilidade antimicrobiana (TSA) comumente utilizados não refletem a real suscetibilidade clínica e falham em prever com eficácia a resposta terapêutica a determina infeção. Neste contexto coloca-se a questão da relevância destes estudos em FQ (50,53).

A avaliação comum da suscetibilidade recorre a meios de cultura líquidos ou sólidos com concentrações fixas de antibióticos, dentro dos *breakpoints* calculados para administração parentérica do antibiótico, o que não se pode transpor para o caso dos antibióticos inalados, em que se conseguem obter concentrações muito superiores.

Para contornar a limitação da formação de biofilmes, nomeadamente pela *P. aeruginosa*, podem usar-se métodos que promovem a formação de biofilmes, simulando de uma forma mais fidedigna as condições em que a infeção ocorre, através da avaliação da concentração inibitória de biofilme e da concentração mínima de erradicação de biofilme (39).

A utilização de métodos que combinam dois ou mais agentes antimicrobianos suscita interesse pelo facto que eles podem ter quer um efeito antagonista, aditivo ou sinérgico. Desta forma, é possível aproximar mais os resultados dos que se verificam na prática clínica, dado que muitas vezes são usadas combinações de antibióticos (39).

No futuro, a utilização de técnicas de sequenciação pode vir a substituir a avaliação de resistência fenotípica por uma avaliação da resistência genotípica, particularmente quando se utilizar técnicas de *whole-genome sequencing* que permitiram

ter uma noção de todos os genes de resistência presentes na amostra colhida, incluindo aqueles transmitidos horizontalmente ou adquiridos por mutação, obtendo então o resistoma.

No cenário atual de resistência aos antibióticos existe a necessidade de encontrar novas terapêuticas. Essas podem passar por novos antibióticos ou por outros agentes que alteram o padrão de suscetibilidades do microrganismo, a sua virulência ou que o tornem mais suscetíveis ao sistema imune, funcionando como potenciadores dos antibióticos atuais (12).

Uma área de grande investigação atualmente é a dos péptidos antimicrobianos. Estes péptidos também designados de defensinas, quando de origem natural, apresentam-se como uma boa opção na terapêutica antimicrobiana pela sua rápida atuação e pela baixa propensão para criar resistências, visto o seu mecanismo de ação ser a disrupção das membranas bacterianas, de entre outros possíveis alvos intracelulares (54). Apresentam atividade contra bactérias resistentes que infetam comumente os pacientes com FQ, nomeadamente *S. aureus* meticilina resistente (55) e *P. aeruginosa* colistina resistente (56).

Ainda em investigação encontram-se alguns compostos com ação anti-biofilme, nomeadamente OligoG, e a utilização de bacteriófagos (57).

Por último, de referir ainda as possibilidades com as novas terapêuticas com os moduladores de *CFTR* (58). No caso do ivacftor, um potenciador do CFTR, foi demonstrada atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (59).

Em última análise, a correção da fisiopatologia da doença pode permitir diminuir a suscetibilidade para infeções recorrentes e limitar a necessidade de tratamento antimicrobiano crónico, deixando de se colocar o problema da resistência antimicrobiana (57).

O Microbioma na Fibrose Quística

Para a compreensão deste tema, primeiramente é necessário esclarecer algumas definições.

A microbiota consiste em todos os microorganismos que se encontram numa determinada região ou habitat. O microbioma é o conjunto desses microorganismos, os seus genes e o ambiente com que eles interagem. Metagenoma traduz a informação genética, DNA, da microbiota, sequenciada através de técnicas de sequenciação de nova geração (60). O metatranscriptoma traduz os genes microbianos expressos, ao sequenciar o RNA. Por último, as análises funcionais disponíveis são a análise proteómica e metabólica, em que são analisadas as proteínas e metabolitos presentes, respetivamente (61).

Para além do microbiota bacteriano têm-se também o viroma (microbiota viral) e o micobioma (microbiota fúngico), verificando-se que não são assim tão acessórios. A sua relevância observa-se na destrinça do papel de alguns vírus na exacerbação da doença pulmonar, verificando-se uma maior gravidade da exacerbação quando é isolado um vírus, ou de fungos no transplante pulmonar ou na aspergilose pulmonar alérgica (60,62,63).

O conceito de disbiose define-se como alteração da composição da microbiota, traduz uma perturbação do seu *status* basal, por qualquer alteração das suas condições locais. Por exemplo, aquando de uma infeção, quando uma espécie se sobrepõe às restantes ou aquando de uma terapêutica antibiótica que destabiliza a flora comensal (60).

O microbioma é um tópico debatido atualmente na comunidade científica, com um crescimento exponencial de publicações nessa área.

No século XIX surgiu a teoria microbiana de doença por Louis Pasteur, seguindo-se dos Postulados de *Koch*, ambas relacionavam os microrganismos com a doença. Assim criou-se o conceito que estes microrganismos eram uma fonte de desequilíbrio da homeostase. Existe crescente evidência que o microbioma tem uma grande influência positiva na homeostase. De entre as funções atualmente atribuídas ao microbioma salientam-se funções metabólicas e de co-metabolismo, imunitárias e resistência à colonização por bactérias patogénicas (61).

Existe também crescente evidência da relação entre a disbiose e doenças inflamatórias das quais se destacam síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal (64), asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e cada vez mais com a fibrose quística (65,66). A disbiose está também associada a doenças infecciosas das quais se destaca a infecção por *Clostridium difficile* pós antibioterapia. Por último, a disbiose tem sido associada a doenças metabólicas como a obesidade e a diabetes, ainda que com menor grau de evidência (61,64).

O estudo do microbioma pulmonar é uma área relativamente recente. Explica-se o atraso relativamente ao estudo do microbioma intestinal, por exemplo, devido à ideia pregressa de que o pulmão era estéril, pelo que a colonização seria sinónimo de infeção. Assim, só desde o início do século XXI, com a aplicação de estudos moleculares de identificação bacteriana, é que se evidenciou que era um local colonizado (60).

Atualmente, reconhece-se que o microbiota pulmonar é muito rico, devendo a sua constituição essencialmente a três contribuidores: a inalação, a microaspiração (origem das bactérias no trato respiratório superior) (67) e o microbiota intestinal, estabelecendo-se o eixo intestino-pulmão (60). Reconhece-se também que a microbiota das vias aéreas superiores é influenciado pela via de parto, assim como que este sofre alterações secundárias a infeções do trato respiratório (68,69).

O eixo intestino-pulmão é bem evidenciado pelo facto de existir uma relação entre os fatores nutricionais e de colonização do intestino com a microbiota pulmonar (70). Demonstrando que essa pode ser uma forma de modulação passível de ser alvo de novas terapêuticas (65).

O estudo do microbioma pulmonar pode ser realizado através de métodos baseados em cultura de secreções brônquicas em meios de crescimento bacteriano ou através de métodos independentes de cultura, nomeadamente métodos moleculares.

Verifica-se que utilizando métodos culturais adequados conseguem-se isolar os microorganismos patogénicos bem conhecidos, como *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ou *Burkholderia cepacia* (6,60).

Os métodos moleculares sequenciam material genético, podendo ser DNA ou RNA, de modo a estudar o microbioma, obtendo-se o metagenoma e o metatranscriptoma,

respetivamente. Ainda dentro do metagenoma podem usar-se duas abordagens, ou sequenciar genes alvo ou sequenciar o genoma completo.

Como limitação dos métodos de sequenciação tem-se a impossibilidade de distinguir adequadamente bactérias viáveis de bactérias inviáveis (66).

Estudos recentes, que utilizam esta técnica de sequenciação, identificaram muitas bactérias, incluindo anaeróbios obrigatórios, que não eram previamente identificados (6,71,72), nomeadamente *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Gamella*, *Graulicatella* e *Fusobacterium* (60,73).

É importante, ainda assim, avaliar os dados obtidos por estas técnicas de sequenciação de nova geração com cautela, pelo risco de se “afogar no próprio tsunami” de dados (74). Requer-se mais estudos que promovam esclarecer a causalidade entre os resultados obtidos e a doença, o que ainda é escasso em dados.

Os estudos indicam que os principais géneros bacterianos que constituem o microbioma dos indivíduos saudáveis são *Streptococcus*, *Prevotella*, *Fusobacteria*, *Veillonella*, *Haemophilus* e *Neisseria* (60).

Nos pacientes com FQ parece existir um aumento da diversidade bacteriana com o estabelecimento de infeção crónica (70). No entanto, é ainda mais evidente a existência de diminuição da diversidade bacteriana com a idade, de diminuição da função pulmonar e de progressão da doença. Esta diminuição da diversidade, mas maior abundância absoluta da carga bacteriana, é acompanhada de um aumento da presença de bactérias patogénicas *H. influenzae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (75). Estas alterações podem dever-se a vários fatores, nomeadamente à progressão da doença com estabelecimento de um ambiente mais propício a estas infeções e/ou ao uso de antimicrobianos que promove a modulação negativa da microbiota com seleção de bactérias com resistências, nomeadamente *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Quando se compara o microbioma de pacientes com FQ com o microbioma de indivíduos saudáveis, verifica-se que as alterações começam cedo, sendo que aos seis meses de idade já é evidente, particularmente em pacientes sintomáticos (76).

Estudos realizados também demonstraram alterações ao nível do microbioma das vias respiratórias superiores nos pacientes com FQ, com enriquecimento de *S. aureus*, *S. mitis* e *Corynebacterium accolens*. Enquanto que *Moraxella spp.*, *Corynebacterium*

pseudodiphthericum, *Corynebacterium propinquum* e *H. influenzae* eram mais abundantes nos indivíduos saudáveis (77). Dada a importância da microaspiração para o estabelecimento do microbioma, estas alterações são relevantes. Em pacientes com FQ existe uma relação entre o aumento da carga bacteriana, com origem na cavidade bucal, e o aumento da inflamação pulmonar, seguida de um aumento da prevalência de bactérias patogênicas que aumentam ainda mais a inflamação pulmonar (26). Existe também evidência que pacientes sem FQ com microbioma pulmonar caracterizado por uma predominância de bactérias comensais supraglóticas apresentam maior inflamação pulmonar (78), o que pode ter também relevância nesta doença.

Subsiste na atualidade uma discussão relativamente ao papel dos anaeróbios no microbioma pulmonar: se estes se apresentam como um fator protetor ou como um fator predisponente de doença.

A favor dos anaeróbios como fator protetor tem-se a demonstração de que existe maior prevalência de anaeróbios em pacientes saudáveis do que nos com doença pulmonar crônica (79) e de que maiores níveis de anaeróbios está associado a melhor função pulmonar e diminuição da inflamação (80).

Contra a tese deste fator benéfico dos anaeróbios, apresenta-se que algumas espécies de bactérias anaeróbias podem aumentar a patogenicidade de bactérias patogênicas comuns da FQ, através da degradação de mucinas e produção de metabolitos que servem de substrato nutritivo dessas bactérias, nomeadamente da *P. aeruginosa* (81). Para além disso, a produção de β -lactamases para o meio pode aumentar a resistência a β -lactâmicos (82). Por outro lado, é difícil provar a causalidade dos argumentos a favor, existindo estudos que demonstram que a diminuição da carga de anaeróbios pode estar relacionado com o uso de antibióticos (83).

Na evidência de um substrato de alterações na microbiota na fisiopatologia da FQ é lógica a abordagem do microbioma como arma terapêutica, como já é feito no caso de patologia intestinal (64). Essa abordagem pode ser realizada através da administração de modificações da dieta, administração de probióticos ou mesmo transplantação de microbiota. Esta última abordagem já é conseguida, com sucesso, através de transplante de microbiota fecal no caso de colite por *C. difficile* (84).

Relativamente à utilização de probióticos, numa revisão sistemática (85), evidenciou-se que o uso de probióticos pode reduzir o número de exacerbações

pulmonares e diminuir a inflamação intestinal, não existindo demonstração relativamente a outros *outcomes* como a progressão da doença, através do declínio da função pulmonar ou colonização por *P. aeruginosa*. Deste modo, ainda que pareçam ter um efeito benéfico na FQ, e nenhum efeito secundário, ainda não existe informação suficiente (espécies, estirpe e dose) para recomendar o uso de probióticos (85).

Importância do Microbioma na avaliação da Resistência aos Antimicrobianos

Quando se considera a resistência aos antimicrobianos na fibrose quística, é mais útil ter em mente que não se aplica o conceito de infecção por um só agente, mas que se trata de uma infecção polimicrobiana, inserida num microbioma complexo, constituindo uma comunidade (39).

Como qualquer comunidade, qualquer fator externo terá impacto na sua organização. Os conceitos de estabilidade, resiliência, resistência e sensibilidade surgem neste contexto. A estabilidade é a inércia para a mudança na presença de um fator externo, enquanto a resiliência é a velocidade em que a comunidade volta ao estado basal após a introdução do fator externo. Resistência é tanto maior quanto maior o estímulo necessário para existir uma mudança e a sensibilidade é o grau de mudança em resposta ao estímulo.

Sendo que o maior fator externo nestas comunidades é o uso de antibióticos, é compreensível a relevância destes conceitos e a sua íntima relação com a resistência aos antibióticos e a elevada propensão para, num ambiente polimicrobiano, uma infecção aguda ter tendência para se tornar crónica.

Comentários finais

“The truth is rarely pure and never simple.”

Oscar Wilde

A Fibrose Quística trata-se de uma doença com uma fisiopatologia complexa. A constante pesquisa de novos conhecimentos e novos alvos terapêuticos torna esta área muito cativante.

Denote-se que se trata de uma doença genética muilitissistémica, aspeto esse que, por si só a torna interessante. Para além disso, um médico para a compreender realmente e a poder tratar adequadamente tem, também, de ter sempre presente os conceitos de microbiologia e infeciologia.

Uma doença, cujos sintomas pulmonares, em tempos foram analisados como “uma maior predisposição para infeções por diminuição da *clearance pulmonar*”, torna-se numa doença com uma fisiopatologia bastante mais complexa, envolvendo os mecanismos genéticos já conhecidos, assim como os conceitos de microbioma.

Ainda no contexto do microbioma, os desafios de esclarecer quais as bactérias patogénicas e quais as que não representam perigo, qual a abordagem terapêutica de modulação do microbioma e a qual a melhor forma de gerir da terapêutica antimicrobiana de modo a não causar disrupções desnecessárias no mesmo, ainda estão em estudo.

Reforça-se a preocupação com a resistência aos antimicrobianos e a necessidade de instituir terapêuticas racionais, com base nos conhecimentos expostos acerca das vias de administração de antibióticos, assim como da necessidade de interpretar os dados obtidos nos testes de suscetibilidade com alguma cautela.

Por último, uma breve reflexão em como as terapêuticas modificadoras de doença, ao atuar no défice do canal *CFTR*, podem vir a alterar totalmente a qualidade de vida dos pacientes e os seus quadros clínicos, tal como a nutrição adequada e as enzimas pancreáticas mudaram a história natural da doença.

Será que daqui a 10 anos, a infeção crónica por *S. aureus* ou por *P. aeruginosa* já não se coloca como um problema?

Agradecimentos

Para dar como concluído este trabalho, não poderia deixar de agradecer a todos os que contribuíram para que ele tenha o seu desfecho com sucesso.

Agradeço à Professora Dra. Celeste Barreto, Diretora Serviço Pediatria Médica, por aceitar orientar a tese, pelas sugestões, correções. Disponibilidade para fornecer bibliografia e recomendar temas a abordar dentro de uma área tão rica como a Fibrose Quística. No fundo, por desde que se apresentou como docente ter demonstrado que a pedagogia e a prática clínica podem, e devem andar a par.

Em segundo lugar, queria agradecer aos meus pais pelo apoio demonstrado durante todo o curso, assim como durante o trabalho final, por me fornecerem a educação necessária e as capacidades para tornar este percurso possível. A minha imensa gratidão também à minha companheira Catarina Costa que, sem reservas, sempre se encontrou disponível para discutir ideias, rever o presente trabalho e partilhar os momentos de descompressão.

Por último, mas tão importantes como os anteriores, um solene agradecimento aos meus amigos Filipa Vassalo, Mafalda Duarte, Pedro Baião, Pedro Silva e Sofia Cunha, por todos os bons momentos ao longo deste percurso, que é o curso de Medicina, sem os quais este seria muito mais penoso; e por demonstrarem mais uma vez que a família não são só aqueles com os quais partilhamos o nosso material genético, mas também os que escolhemos para nos acompanhar durante a vida.

Bibliografia

1. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child*. 1938;
2. Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. *Harrison's principles of internal medicine*. 20th ed. New York: McGraw Hill Education; 2018. 1986–1989 p.
3. Benjamin I, Griggs RC, Fitz JG, Wing EJ. *Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine*. 9th ed. Elsevier; 2016. 217–218 p.
4. Marcante KJ, Kliegman RM. *Nelson Essentials of Pediatrics*. 8th ed. Elsevier; 2018. 526–529 p.
5. Direção-Geral da Saúde. Tratamento e Seguimento da Fibrose Quística em Idade Pediátrica e no Adulto. In: Norma nº 032/2012, 09/06/2015 [Internet]. Available from: <https://www.dgs.pt/normas-clinicas/normas-clinicas.aspx>
6. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet* [Internet]. 2016 Nov;388(10059):2519–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616005766>
7. Marcão A, Barreto C, Pereira L, Vaz L, Cavaco J, Casimiro A, et al. Cystic Fibrosis Newborn Screening in Portugal: PAP Value in Populations with Stringent Rules for Genetic Studies. *Int J Neonatal Screen*. 2018;4(3):22.
8. Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2006.
9. Barreto C. Fibrose Quística. In: Gomes MJM, Sotto-Mayor R, editors. *Tratado de pneumologia*. Lisboa: Permanyer; 2003. p. 927–43.
10. Cystic Fibrosis Trust. UK Cystic Fibrosis Registry Annual data report 2017. *Cyst Fibros Regist*. 2018;(July).
11. Orenti A, Naehrlich L, Van Rens J. *ECFSRP Annual Report 2016*. 2018; Available from: www.ecfs.eu/ecfspr
12. Waters V, Smyth A. Cystic fibrosis microbiology: Advances in antimicrobial therapy. *J Cyst Fibros*. 2015;14(5):551–60.
13. Human Genome Variation Society. Cystic fibrosis mutation database [Internet].

- Cystic Fibrosis Mutation Database. Available from: <http://genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>
14. Rosenstein BJ, Zeitlin PL. Cystic fibrosis. *Lancet* [Internet]. 1998 Jan;351(9098):277–82. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673697091745>
 15. Direção-Geral da Saúde. Diagnóstico da Fibrose Quística em Idade Pediátrica e no Adulto. In: Norma nº 031/2012, 30/07/2015 [Internet]. Available from: <https://www.dgs.pt/normas-clinicas/normas-clinicas.aspx>
 16. De Boeck K, Kent L, Davies J, Derichs N, Amaral M, Rowe SM, et al. CFTR biomarkers: Time for promotion to surrogate end-point? *Eur Respir J*. 2013;41(1):203–16.
 17. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of Cystic Fibrosis: Consensus Guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. *J Pediatr* [Internet]. 2017;181:S4-S15.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.09.064>
 18. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of Cystic Fibrosis Lung Disease. *N Engl J Med*. 2015;
 19. Sly PD, Brennan S, Gangell C, De Klerk N, Murray C, Mott L, et al. Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(2):146–52.
 20. Armstrong DS, Hook SM, Jamsen KM, Stats A, Nixon GM, Carzino R, et al. Lower Airway Inflammation in Infants With Cystic Fibrosis Detected by Newborn Screening. *Pediatr Pulmonol*. 2005;510(October):500–10.
 21. McCarron A, Donnelley M, Parsons D. Airway disease phenotypes in animal models of cystic fibrosis. *Respir Res* [Internet]. 2018 Dec 2;19(1):54. Available from: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-018-0750-y>
 22. Lavelle GM, White MM, Browne N, McElvaney NG, Reeves EP. Animal Models of Cystic Fibrosis Pathology: Phenotypic Parallels and Divergences. *Biomed Res Int*. 2016;2016.

23. Rosen BH, Evans TIA, Moll SR, Gray JS, Liang B, Sun X, et al. Infection is not required for mucoinflammatory lung disease in CFTR-Knockout ferrets. Vol. 197, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2018. 1308–1318 p.
24. Bragonzi A, Horati H, Kerrigan L, Lorè NI, Scholte BJ, Weldon S. Inflammation and host-pathogen interaction: Cause and consequence in cystic fibrosis lung disease. Journal of Cystic Fibrosis. 2018.
25. Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. Journal of Cystic Fibrosis. 2015.
26. Muhlebach MS, Zorn BT, Esther CR, Hatch JE, Murray CP, Turkovic L, et al. Initial acquisition and succession of the cystic fibrosis lung microbiome is associated with disease progression in infants and preschool children. PLoS Pathog. 2018;14(1):1–20.
27. Mall MA. Unplugging mucus in cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. Ann Am Thorac Soc. 2016;13:S177–85.
28. Zhou-Suckow Z, Duerr J, Hagner M, Mall MA. Airway mucus, inflammation and remodeling: emerging links in the pathogenesis of chronic lung diseases. Cell Tissue Res. 2017;367(3):537–50.
29. Esther CR, Muhlebach MS, Ehre C, Hill DB, Wolfgang MC, Kesimer M, et al. Mucus accumulation in the lungs precedes structural changes and infection in children with cystic fibrosis. Sci Transl Med [Internet]. 2019;11(486):eaav3488. Available from: <http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aav3488>
30. Fritzsche B, Zhou-Suckow Z, Trojanek JB, Schubert SC, Schatterny J, Hirtz S, et al. Hypoxic epithelial necrosis triggers neutrophilic inflammation via IL-1 receptor signaling in cystic fibrosis lung disease. Am J Respir Crit Care Med. 2015;191(8):902–13.
31. Montgomery ST, Mall MA, Kicic A, Stick SM. Hypoxia and sterile inflammation in cystic fibrosis airways: Mechanisms and potential therapies. Eur Respir J. 2017;49(1):1–13.
32. Pressler T. Targeting Airway Inflammation in Cystic Fibrosis in Children. Pediatr

- Drugs. 2011;13(3):141–7.
33. Cramer CL, Patterson A, Alchakaki A, Soubani AO. Immunomodulatory indications of azithromycin in respiratory disease: a concise review for the clinician. *Postgrad Med* [Internet]. 2017;129(5):493–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/00325481.2017.1285677>
 34. Nick JA, Moskowitz SM, Chmiel JF, Forssén A V., Kim SH, Saavedra MT, et al. Azithromycin may antagonize inhaled tobramycin when targeting *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(3):342–50.
 35. Phaff SJ, Tiddens HAWM, Verbrugh HA, Ott A. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(4):741–6.
 36. Tramper-Stranders GA, Wolfs TFW, Fleer A, Kimpen JLL, van der Ent CK. Maintenance Azithromycin Treatment in Pediatric Patients With Cystic Fibrosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;26(1):8–12.
 37. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: Diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med* [Internet]. 2014;34(2):197–217. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2014.02.001>
 38. O’neill J. Tackling drug resistant infections globally: Final report and recommendations. The Review on AMR. 2016.
 39. Kidd TJ, Canton R, Ekkelenkamp M, Johansen HK, Gilligan P, LiPuma JJ, et al. Defining antimicrobial resistance in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018.
 40. Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet*. 2014;384(9944):703–13.
 41. Nair CG, Chao C, Ryall B, Williams HD. Sub-lethal concentrations of antibiotics increase mutation frequency in the cystic fibrosis pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Lett Appl Microbiol*. 2013;
 42. Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y, Zhang C, et al. Antimicrobial activity and resistance: Influencing factors. *Frontiers in Pharmacology*. 2017.

43. Szczesniak RD, Cogen JD, Rosenfeld M. Associating antimicrobial susceptibility testing with clinical outcomes in cystic fibrosis: More rigor and less frequency? *J Cyst Fibros*. 2019;
44. Flume PA, Waters VJ, Bell SC, Van Devanter DR, Stuart Elborn J. Antimicrobial resistance in cystic fibrosis: Does it matter? *J Cyst Fibros*. 2018;17(6):687–9.
45. Bos AC, Passé KM, Mouton JW, Janssens HM, Tiddens HAWM. The fate of inhaled antibiotics after deposition in cystic fibrosis: How to get drug to the bug? *J Cyst Fibros*. 2017;16(1):13–23.
46. Patel J, Richter S. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In: Pfaller MA, Richter SS, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Carroll KC, et al., editors. *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. 11th ed. American Society of Microbiology; 2015. p. 1216. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381>
47. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition* [Internet]. American Society of Microbiology; p. 481–511. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555819286.chap17>
48. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*. 2010.
49. Peterson E, Kaur P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front Microbiol*. 2018;
50. Somayaji R, Parkins MD, Shah A, Martiniano SL, Tunney MM, Kahle JS, et al. Antimicrobial susceptibility testing (AST) and associated clinical outcomes in individuals with cystic fibrosis: A systematic review. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2019 Jan; Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569199319300141>
51. Rogers GB, Bruce KD, Hoffman LR. How can the cystic fibrosis respiratory microbiome influence our clinical decision-making? *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2017.

52. Doern G V., Brecher SM. The clinical predictive value (or lack thereof) of the results of in vitro antimicrobial susceptibility tests. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9 SUPPL.):11–4.
53. Hurley MN, Ariff AHA, Bertenshaw C, Bhatt J, Smyth AR. Results of antibiotic susceptibility testing do not influence clinical outcome in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2012;11(4):288–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2012.02.006>
54. Scocchi M, Mardirossian M, Runti G, Benincasa M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Curr Top Med Chem.* 2015;16(1):76–88.
55. Yuan Y, Zai Y, Xi X, Ma C, Wang L, Zhou M, et al. A novel membrane-disruptive antimicrobial peptide from frog skin secretion against cystic fibrosis isolates and evaluation of anti-MRSA effect using *Galleria mellonella* model. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2019;1863(5):849–56. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416519300479?dgcid=rs_s_sd_all
56. Molchanova N, Wang H, Hansen PR, Høiby N, Nielsen HM, Franzyk H. Antimicrobial Activity of α -Peptide/ β -Peptoid Lysine-Based Peptidomimetics Against Colistin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Cystic Fibrosis Patients. *Front Microbiol* [Internet]. 2019;10(February):1–9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00275/full>
57. Davies JC, Martin I. New anti-pseudomonal agents for cystic fibrosis- still needed in the era of small molecule CFTR modulators? *Expert Opin Pharmacother.* 2018;19(12):1327–36.
58. Donaldson SH, Solomon GM, Joseloff E, Beekman JM, Boeck KD, Cutting G, et al. CFTR modulator theratyping: Current status, gaps and future directions. *J Cyst Fibros.* 2018;18(1):22–34.
59. Welsh MJ, Stoltz DA, Diekema DJ, Gansemer ND, Abou Alaiwa MH, Dohrn CL, et al. Antibacterial properties of the CFTR potentiator ivacaftor. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2014;13(5):515–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2014.02.004>

60. Athanazio RA, Costa AN, Costa FM da, Salles RK, Campos SV. The pulmonary microbiome: challenges of a new paradigm. *J Bras Pneumol*. 2018;
61. Young VB. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ* [Internet]. 2017 Mar 15;j831. Available from: <http://www.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmj.j831>
62. Le Berre R, Payan C, Vallet S, Héry-Arnaud G, Billard L, Pilorgé L. Viruses in cystic fibrosis patients' airways. *Crit Rev Microbiol* [Internet]. 2017;43(6):690–708. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2017.1297763>
63. Hong G, Lechtzin N. Cystic fibrosis: We see fungus among us, but should we care? *J Cyst Fibros*. 2019;
64. Whelan K, Quigley EMM. Probiotics in the management of irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2013;29(2):184–9.
65. Gollwitzer ES, Marsland BJ. Microbiota abnormalities in inflammatory airway diseases - Potential for therapy. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;141(1):32–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.08.002>
66. Caverly LJ, Zhao J, LiPuma JJ. Cystic fibrosis lung microbiome: Opportunities to reconsider management of airway infection. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50:S31–8.
67. Prevaes SMPJ, De Steenhuijsen Piter WAA, De Winter-De Groot KM, Janssens HM, Tramper-Stranders GA, Chu MLJN, et al. Concordance between upper and lower airway microbiota in infants with cystic fibrosis. *Eur Respir J* [Internet]. 2017;49(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02235-2016>
68. Bosch AATM, Levin E, van Houten MA, Hasrat R, Kalkman G, Biesbroek G, et al. Development of Upper Respiratory Tract Microbiota in Infancy is Affected by Mode of Delivery. *EBioMedicine* [Internet]. 2016;9:336–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.031>
69. Bosch AATM, Piter WAA de S, van Houten MA, Chu MLJN, Biesbroek G, Kool J, et al. Maturation of the Infant Respiratory Microbiota, Environmental Drivers, and Health Consequences. A Prospective Cohort Study. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2017 Dec 15;196(12):1582–90. Available from:

- <http://www.atsjournals.org/doi/10.1164/rccm.201703-0554OC>
70. Madan JC, Koestler DC, Stanton BA, Davidson L, Moulton LA, Housman ML, et al. Serial Analysis of the Gut and Respiratory Microbiome in Cystic Fibrosis in Infancy: Interaction between Intestinal and Respiratory Tracts and Impact of Nutritional Exposures. Ausubel FM, editor. MBio [Internet]. 2012 Aug 21;3(4):1–10. Available from: <https://mbio.asm.org/lookup/doi/10.1128/mBio.00251-12>
 71. Tunney MM, Einarsson GG, Wei L, Drain M, Klem ER, Cardwell C, et al. Lung microbiota and bacterial abundance in patients with bronchiectasis when clinically stable and during exacerbation. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187(10):1118–26.
 72. Fodor AA, Klem ER, Gilpin DF, Elborn JS, Boucher RC, Tunney MM, et al. The Adult Cystic Fibrosis Airway Microbiota Is Stable over Time and Infection Type, and Highly Resilient to Antibiotic Treatment of Exacerbations. PLoS One. 2012;7(9).
 73. Parkins MD, Floto RA. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. J Cyst Fibros [Internet]. 2015;14(3):293–304. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2015.03.012>
 74. Hanage WP. Microbiology: Microbiome science needs a healthy dose of scepticism. Nature [Internet]. 2014 Aug 20;512(7514):247–8. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/512247a>
 75. Frayman KB, Armstrong DS, Carzino R, Ferkol TW, Grimwood K, Storch GA, et al. The lower airway microbiota in early cystic fibrosis lung disease: A longitudinal analysis. Thorax. 2017;72(12):1104–12.
 76. Frayman KB, Wylie KM, Armstrong DS, Carzino R, Davis SD, Ferkol TW, et al. Differences in the lower airway microbiota of infants with and without cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2018;
 77. Prevaes SMPJ, de Winter-de Groot KM, Janssens HM, de Steenhuijsen Piters WAA, Tramper-Stranders GA, Wylie AL, et al. Development of the Nasopharyngeal Microbiota in Infants with Cystic Fibrosis. Am J Respir Crit Care Med [Internet]. 2016 Mar;193(5):504–15. Available from: <http://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1513/AnnalsATS.201601-078OC>

78. Segal LN, Alekseyenko A, Clemente JC, Berger K, Goldring R, Rom WN, et al. Enrichment of Lung Microbiome with Supraglottic Microbes Is Associated with Increased Pulmonary Inflammation. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(Supplement 1):S71–S71.
79. Einarsson GG, Comer DM, McIlreavey L, Parkhill J, Ennis M, Tunney MM, et al. Community dynamics and the lower airway microbiota in stable chronic obstructive pulmonary disease, smokers and healthy non-smokers. *Thorax*. 2016;71(9):795–803.
80. O'Neill K, Bradley JM, Johnston E, McGrath S, McIlreavey L, Rowan S, et al. Reduced bacterial colony count of anaerobic bacteria is associated with a worsening in lung clearance index and inflammation in cystic fibrosis. *PLoS One*. 2015;10(5).
81. Flynn JM, Niccum D, Dunitz JM, Hunter RC. Evidence and Role for Bacterial Mucin Degradation in Cystic Fibrosis Airway Disease. *PLoS Pathog*. 2016;12(8):1–21.
82. Sherrard LJ, McGrath SJ, McIlreavey L, Hatch J, Wolfgang MC, Muhlebach MS, et al. Production of extended-spectrum β -lactamases and the potential indirect pathogenic role of *Prevotella* isolates from the cystic fibrosis respiratory microbiota. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2016 Feb;47(2):140–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924857915004197>
83. Zhao J, Schloss PD, Kalikin LM, Carmody LA, Foster BK, Petrosino JF, et al. Decade-long bacterial community dynamics in cystic fibrosis airways. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(15):5809–14.
84. Quraishi MN, Widlak M, Bhala N, Moore D, Price M, Sharma N, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;46(5):479–93.
85. Anderson JL, Miles C, Tierney AC. Effect of probiotics on respiratory, gastrointestinal and nutritional outcomes in patients with cystic fibrosis: A systematic review. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2017.